

二化螟热休克蛋白 70 基因的克隆及热胁迫下的表达分析

崔亚东^{1,2}, 陆明星¹, 杜予州^{1,*}

(1. 扬州大学应用昆虫研究所, 江苏扬州 225009; 2. 阜阳师范学院生命科学学院, 安徽阜阳 236032)

摘要: 热休克蛋白 70 是已知热休克蛋白家族中重要的一种, 它在细胞内的大量表达可以明显改善细胞的生存能力, 提高对环境胁迫的耐受性。为探讨热胁迫对二化螟 *Chilo suppressalis* 幼虫热休克蛋白 70 表达的影响, 采用 RT-PCR 及 RACE 技术从二化螟血淋巴细胞中克隆了热休克蛋白 70 基因全长 cDNA 序列。该基因全长 2 102 bp, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 1 959 bp, 编码 652 个氨基酸; 5' 非编码区 (untranslated region, UTR) 为 81 bp, 3'UTR 为 62 bp。从该基因推导的氨基酸序列与其他昆虫的同源序列比较有很高的相似性 (73%~97%)。实时定量 PCR 显示二化螟 HSP70 基因能被热胁迫诱导表达, 幼虫血淋巴细胞的 HSP70 基因在 36℃ 时表达量最高。流式细胞术研究发现 HSP70 在蛋白质水平上的表达变化与在 mRNA 水平上高度一致, 说明二化螟 HSP70 基因在转录及翻译水平上受到热应激的调节。

关键词: 二化螟; 热休克蛋白; HSP70; RACE; 表达; 热胁迫

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)08-0841-08

Cloning of the heat shock protein 70 gene from *Chilo suppressalis* and the analysis of its expression characteristics under heat stress

CUI Ya-Dong^{1,2}, LU Ming-Xing¹, DU Yu-Zhou^{1,*} (1. Institute of Applied Entomology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; 2. Department of Life Science, Fuyang Teachers College, Fuyang, Anhui 236032, China)

Abstract: Heat shock protein 70 (HSP70) is one of the most conservative and important proteins in heat shock protein family. Overexpression of HSP70 may obviously improve the survivability of cells, and enhance their tolerance to stress. To investigate the effects of heat stress on HSP70 expression in *Chilo suppressalis* larvae, RT-PCR and RACE methods were used for cloning the full length cDNA encoding HSP70 from haemocytes of *C. suppressalis* in this study. The cDNA obtained is 2 102 bp in length, containing an ORF of 1 959 bp, encoding 652 amino acid residues, with a 5'UTR of 81 bp and a 3'UTR of 62 bp. Cluster analysis confirmed that the deduced amino acid sequence shared high identity with the reported homologous sequences from other insects (73%–97%). Real-time quantitative PCR showed that HSP70 gene expression could be induced by heat stress. The maximal induction of HSP70 gene expression in larval haemocytes of *C. suppressalis* was achieved at 36℃. HSP70 protein expression was observed by using flow cytometry. The results revealed that the expression profiles of HSP70 at both the mRNA level and the protein level are highly in agreement with each other.

Key words: *Chilo suppressalis*; heat shock protein (HSP); HSP70; RACE; expression; heat stress

热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 是细胞或生物体受到环境胁迫或有害刺激后合成的一类遗传上高度保守的蛋白, 在原核生物和真核生物中普遍存在, 参与蛋白质的合成、折叠、装配、跨膜、转运以及变性蛋白质的清除等, 起到分子伴侣的作用

(Johnston *et al.*, 1998; Feder and Hofmann, 1999)。根据分子量不同, 可将热休克蛋白分为热休克蛋白 90 (HSP90)、热休克蛋白 70 (HSP70)、热休克蛋白 60 (HSP60) 和小分子热休克蛋白 (sHSP) 等多个家族 (Feder and Hofmann, 1999; Sørensen *et al.*, 2003)。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (“973” 计划) 项目 (2006CB102002)

作者简介: 崔亚东, 男, 1963 年生, 安徽阜阳人, 博士, 副教授, 主要从事昆虫生化及分子生物学研究, E-mail: yadongcui@yahoo.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yzdu@yzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-03-25; 接受日期 Accepted: 2010-06-18

HSP70 是热休克蛋白家族的主要一员,它是细胞在热激条件下的主要表达产物(Sørensen *et al.*, 2003)。研究表明, HSP70 与生物体的适应能力具有重要的相关性,其大量表达有助于维持细胞内稳态,改善机体的生存能力和提高对环境胁迫或伤害的耐受性(Feder and Hofmann, 1999)。因而,选用保守的 HSP70 作为分子标记物来研究同种生物在不同温度诱导下的表达变化规律,可以更好地了解物种生态适应的分子机理和耐热机制(Yocum, 2001; Hellmann, 2002; McMillan *et al.*, 2005; Sørensen *et al.*, 2005)。目前热胁迫下的分子适应机理在多种昆虫中进行了广泛研究,结果表明不同昆虫的 HSP70 在转录及翻译水平上应答反应各不相同(Wang and Kang, 2005; Huang and Kang, 2007; 陈亮等, 2007; 崔旭红等, 2007; 王海鸿和雷仲仁, 2008; Bahrndorff *et al.*, 2009)。

二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 是水稻上的主要害虫之一,在我国从南到北均有分布,并具有很强的抗逆性。有关环境温度对二化螟影响的研究已有报道,但主要是研究温度对二化螟种群生长发育、存活和繁殖的影响以及耐寒性研究(陈常铭等, 1957; 罗举等, 2005; 强承魁等, 2008)。而有关二化螟对热胁迫适应的分子机理至今未见报道。血淋巴细胞可通过开放的循环系统遍布昆虫各个组织器官,分析昆虫血淋巴细胞中 HSP70 的表达变化,对最终评价昆虫抗逆能力是不可或缺的。本实验利用 RACE 方法,克隆并测定了二化螟 HSP70 cDNA 的全长序列;通过实时荧光定量 PCR 和流式细胞术等方法,分析了热胁迫下二化螟幼虫血淋巴细胞 HSP70 在 mRNA 和蛋白质水平上表达量的变化,从分子水平探讨二化螟幼虫的抗逆适应机理。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及血淋巴细胞制备

二化螟幼虫采自江苏扬州郊区水稻田,在实验室利用水稻种苗人工饲养繁殖。饲养环境条件:温度 28℃, RH > 80%, 光周期 16L: 8D。实验虫态为个体大小一致的 5 龄幼虫。将二化螟 5 龄幼虫用蒸馏水冲洗 2 次,冷冻麻醉,剪破腹足,轻轻挤压虫体,将流出的血淋巴转移到含有 200 μ L PBS 缓冲液的 Eppendorf 管中(内有少量苯基硫脲)。稀释后的血淋巴在 4℃, 800 g 离心 5 min, 弃上清,沉淀

的血淋巴细胞用 PBS 漂洗 2 次,用于 RNA 的提取以及 HSP70 蛋白流式细胞检测。

1.2 试剂

UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒购自上海生物工程公司; Taq 酶、M-MLV 反转录酶、3'-Full RACE 试剂盒(TaKaRa Code: D314)、5'-Full RACE 试剂盒(TaKaRa Code: D315)、pMD18-T 载体和 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 等购自大连宝生物公司(TaKaRa); DNA 回收试剂盒为北京百泰克生物公司产品;兔抗 HSP70、异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗兔 IgG、抗体稀释液等购自武汉博士德生物工程公司;大肠杆菌菌株 DH5 α 为本实验室保存;引物由上海生物工程公司合成。

1.3 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成

血淋巴细胞内总 RNA 提取按照上海生工公司的 Trizol RNA 提取试剂盒说明进行。以总 RNA 为模板, Oligo (dT) 为引物, 利用 M-MLV 反转录酶合成 cDNA 第一链。用于 3' RACE 及 5' RACE 的 cDNA 第一链合成按 TaKaRa 试剂盒说明进行。

1.4 HSP70 基因中间片段的克隆

利用 BLAST 分析 NCBI 已经登录的其他昆虫 HSP70 氨基酸序列的保守区域,设计一对简并引物 P1 和 P2 (表 1) 用于扩增 HSP70 基因中间片段。反应条件: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环后再 72℃ 延伸 10 min。反应结束后用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物,回收目的片段进行克隆测序。

1.5 HSP70 基因的 3'RACE

根据所克隆到的中间片段测序结果设计特异引物,利用 3'RACE 法延伸 HSP70 基因 3'端,参照大连宝生物公司(TaKaRa)产品说明进行:以总 RNA 为模板,采用试剂盒内的接头引物和反转录酶合成 3'RACE cDNA;再以转录产物为模板,用特异引物 3'GSP1 (表 1) 和试剂盒内的通用引物 3'RACE Outer Primer 进行第 1 轮 PCR;以第 1 轮 PCR 产物为模板,利用特异引物 3'GSP2 (表 1) 和试剂盒内的通用引物 3'RACE Inner Primer 进行第 2 轮巢式 PCR。反应条件参照试剂盒内说明书进行。反应结束后用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物,回收目的片段进行克隆测序。

1.6 HSP70 基因的 5'RACE

根据已知中间片段序列设计特异性引物,参照大连宝生物公司(TaKaRa) 5'Full RACE 试剂盒说明

表 1 实验中所用引物列表

Table 1 Primer sequences used in the cDNA cloning and real-time PCR in this study

引物类型 Primer type	引物序列 Primer sequence (5' -3')
cDNA isolation (RT-PCR)	
P1	AGCCTACAAAGGTGAAGATAA
P2	TGTCAAGACCGTAAGCAAT
5'- and 3'-cDNA end isolation (RACE)	
5'GSP1	ACAAAGATGAAGGAAACAGCCGAC
5'GSP2	CGAATCATCAACGAACCTACTGCT
5'RACE outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
5'RACE inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG
3'GSP1	CAGCAGCAGTAGGTTTCGTTGAT
3'GSP2	GCCTCGGCTGTTTCCTTCATCT
3'RACE outer primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
3'RACE inner primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG
Primers used in quantitative PCR	
P3	AGCCTACAAAGGTGAAGATAA
P4	TGTCAAGACCGTAAGCAAT
P5	TCGAGCCGCACGAGATTGAGCA
P6	CAAAGGGCAGGGACGTAATCAAC

明进行：对提取的总 RNA 进行 CIAP、TAP 处理，并与 5'RACE 接头连接后，反转录合成 cDNA，同时进行 M-MLV(-)与 TAP(-)实验。以上述 cDNA 为模板，使用特异引物 5'GSP1(表 1)和试剂盒内的通用引物 5'RACE Outer Primer 进行第 1 轮 PCR；以第 1 轮 PCR 产物为模板，使用特异引物 5'GSP2(表 1)及试剂盒提供的通用引物 5'RACE Inner Primer 进行第 2 轮 PCR 扩增。反应条件参照试剂盒内说明书进行。反应结束后用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物，回收目的片段进行克隆测序。

1.7 扩增产物的克隆与序列测定

用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物。回收产物与 pMD18-T 载体进行连接，连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α ，在含氨苄青霉素的培养基上进行蓝白斑筛选，随机挑取白色菌落，进行菌落 PCR 鉴定。阳性菌液送上海生物工程公司测序。根据测序得到的 5'和 3'端片段的序列，分别设计扩增全长 cDNA 的引物，用来验证基因的完整性。

1.8 氨基酸序列比较及同源性分析

用 BLAST 进行同源性比较；开放阅读框 (ORF)用(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析；利用(<http://au.expasy.org/>)推导氨基酸序列及分子量估算；利用 ClustalX 将推导的二化螟 HSP70 氨基酸序列与其他已知的 8 种昆虫

HSP70 氨基酸序列进行多序列比对分析，用 PHYLIP 软件采用 NJ 方法构建系统进化树。

1.9 HSP70 基因实时定量分析

随机挑选 15 头 5 龄幼虫作为一实验组，每一实验组设 3 个重复。热胁迫不同温度处理为：33 $^{\circ}\text{C}$ ，36 $^{\circ}\text{C}$ 和 39 $^{\circ}\text{C}$ ，每一个温度处理组各处理 2 h 作为实验组，对照组为 28 $^{\circ}\text{C}$ 。

按上述方法收集血淋巴细胞，提取总 RNA，反转录成 cDNA。根据克隆的二化螟 HSP70 基因 cDNA 全序列，设计用于实时定量 PCR 的引物 P3 和 P4(表 1)。二化螟 18S rRNA 被克隆 (GenBank 登录号：GQ265912)作为实时定量 PCR 的内标，并设计其一对引物 P5 和 P6(表 1)用于 PCR 扩增。采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 real-time PCR 扩增反应。PCR 反应体系为 20 μL ：SYBR $^{\text{®}}$ Premix Ex Taq $^{\text{TM}}$ (2 $\times$) 10 μL ，ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.4 μL ，10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 0.4 μL ，cDNA 模板 2 μL ，灭菌超纯水 6.8 μL 。用 2 步法进行 PCR，在 ABI7500 PCR 仪(美国应用生物系统公司)上进行：95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s；随后 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，40 个循环。反应结束后，由溶解曲线判定 PCR 反应的特异性。采用比较 C_{T} 相对定量法 (Livak and Schmittgen, 2001)，该方法在假设目标基因片段和持家基因片段扩增效率一致的情况下，通过 $2^{-\Delta\Delta C_{\text{T}}}$

方法进行相对定量, C_T 值为荧光信号有统计学意义显著增长时的循环次数, ΔC_T 值为目的基因 C_T 与管家基因 C_T 的差值, $\Delta\Delta C_T$ 为各试验组 ΔC_T 与选择的对照组 ΔC_T 的差值, 平均相对含量 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 为相对于对照组水平的倍数。

1.10 流式细胞仪检测 HSP70 蛋白水平

随机挑选 15 头 5 龄幼虫作为一实验组, 每一实验组设 3 个重复。幼虫热胁迫处理按 1.9 方法进行。收集的血淋巴细胞固定于 4% 多聚甲醛中, 4℃ 保存备用。血淋巴细胞内 HSP70 蛋白检测参照文献(沈关心和周汝麟, 2002; 曲凌云等, 2004)。

取多聚甲醛固定的细胞, 800 r/min 离心 10 min, PBS 重悬细胞。重悬后每个样本分两份: 一份作为阳性处理样, 另一份作为阴性本底对照。阳性处理样进行如下处理: 样品经 0.1% Triton-100 破膜, 加入 200 μ L 按 1:200 稀释的单克隆抗体兔抗 HSP70, 18℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤细胞。加入 300 μ L 按 1:100 稀释的 FITC 标记的二抗羊抗兔 IgG, 18℃ 避光孵育 30 min, PBS 洗涤细胞, 0.3 mL PBS 重悬后用流式细胞仪(美国 BD 公司)在 488 nm 波长分析。阴性本底对照: 不进行兔抗 HSP70 孵育, 其余同阳性处理样。

流式细胞仪计数 10 000 个细胞, 细胞荧光强度信号反映细胞中标记蛋白的表达量。每个样本的阳性处理样的平均荧光强度和阴性本底对照的平均荧光强度比值反映该样本的相对蛋白表达水平。

1.11 数据统计与分析

实验数据用平均数 $\pm$ 标准差(SD)表示; 组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)。所有数据由 SPSS 11.0 软件分析处理, $P < 0.05$ 为可接受的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 二化螟 HSP70 基因的克隆及序列分析

采用 RT-PCR 方法, 用简并引物 P1 和 P2 扩增出符合预期大小的目的条带, 回收克隆后测序, 获得 244 bp 的序列, 通过 NCBI 数据库 BLAST 检索, 与其他物种的 HSP70 基因序列有较高的同源性。根据已获得的基因序列, 设计特异性引物, 进行 cDNA 末端快速扩增(RACE)。测序结果表明, 5' RACE 扩增反应得到 312 bp 的条带, 3' RACE 的产物长度为 1 726 bp。利用 DNAMAN 软件将相互重

叠的两次 RACE 和中间片段序列进行拼接, 得到 2 102 bp 的二化螟 HSP70 基因全长序列。为了验证拼接基因序列的正确性, 通过已获得的序列, 在基因两端设计特异性引物, 以总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 进行 PCR 反应, 扩增全长 cDNA 片段。克隆测序后得到的序列, 与拼接的序列比对后发现没有差异, 进一步验证了基因序列的准确性和完整性。将获得的全长序列提交到 GenBank, 登录号为 GU726137。

利用 NCBI 的 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)对序列进行分析, 该序列 5' 端存在 81 bp 的非编码区(UTR), 3' 端非编码区(UTR)为 62 bp; 中间的开放阅读框(ORF)长度为 1 959 bp, 起始密码子 ATG, 终止密码子 TAA, 编码 652 个氨基酸, 利用分子量及等电点估算软件(<http://au.expasy.org/>), 推测的分子量为 71 242 Da, 等电点 pI 为 5.33。用蛋白质软件 Antheptot 分析二化螟 HSP70 蛋白, 发现 3 个 HSP70 家族的签名序列: IDLGTTYS(9~16 残基), IFDLGGGTDFVS IL(197~210 残基), IVLVGGSTRIPKVQK(334~348 残基); Dank 特征基序 DLGTT-S-V(10~18 残基), 非细胞器基序 RARFEEL(298~304 残基), 胞质 HSP70 特征基序 GPTIEEVD(645~652 残基)以及靠近 C 端的 GGMP4 肽序列; 2 个糖基化位点 NKSI 和 NVSA。根据所获得的序列符合 HSP70 家族所特有的氨基酸序列特征, 因此确认该序列是二化螟 HSP70 基因完整编码区 cDNA 序列(图 1)。

将推导出的氨基酸序列与 NCBI 上登录的其他 8 种昆虫同源序列比较, 发现同源相似性达 70% 以上, 其中与粉茎螟 *Sesamia nonagrioides* 及家蚕 *Bombyx mori* 的关系最近, 同源性均为 97%; 与东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 同源性为 92%; 与谢氏宽漠王 *Mantichorula semenowi* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 同源性为 91%; 与摇蚊 *Chironomus tentans*、微红绒茧蜂 *Cotesia rubecula* 和美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* 的同源性分别为 89%, 88% 和 73%。利用 ClustalX 和 MEGA2.1 程序将氨基酸序列进行进化树分析, 结果如图 2 所示。

3.2 热胁迫下 HSP70 mRNA 相对表达情况

为了比较不同热胁迫温度对二化螟血淋巴细胞 HSP70 mRNA 表达变化的影响, 通过实时定量 PCR 检测发现, 热激可以诱导 HSP70 mRNA 的表达, 不同胁迫温度处理与对照组相比均有显著差异($P < 0.05$), 33℃, 36℃ 和 39℃ 处理 2 h 后, 幼虫血淋巴

1 caagaaaaatagccgtcaatcgtgcacgttttcgagtggtctctcttttataagtcacaaagttctagtttaatttacaca
82 atggcgaaagaccaccgcagtttggtatctgcatttggccaccacgtatcgctggtgggtgtgttcacagatggcaaggtggagatctacgca
1 MA K A P A U G I D L G L T V S C U G U F Q H G K U E I A
172 aacgaccaggggcaacaggaccacgcgcgtcgtatgtgcgattcactgcactgagcgccctcagcgcgacgcgcgaagaaccaggtggcg
31 N D Q G A N R T I T P S V Y A F T I D T E R L I G D A A K N Q V A
262 atgaaccaacacacacacattcttcgtagccaaacgtcttattggagcttaagttgaagatggcaccagctgacatgaagcactgg
61 M N P N N T I F D A A C K R A L I G R K F E D A T U Q Q D M K H U
352 ccttttgagggtgtcagtgatggaggtaaacraagattaaagtagcctacaaaggtagaataagactttcttccctgaagaagtaagc
91 P F E U U S D G G G K P K I K U A Y K G E D K T F F P E E U S
442 tcaattggttctacaagaatgaaggaatacagcaggcctaacctcggtaaaactgtgcagaatgcagtaattacgggtccagcacttct
121 S M U L T I T K H K E A C E A Y L G K T U Q N A U I T U P A Y F
532 aacgactctcaagacaggccacaaaagattcagggtacaatctctggtctgaacgttctccgaatcatcaacgaacctactgctgctgcg
151 N D S Q R Q A T K D S G T I S G L N U L R I I N E P T A A A
622 attgcttaccggtcttgacaagaagggaagggtgggaacgttaacgtctattttcgactttggtgtggcacttttgatgtgccatttg
181 I A Y G G L D K K G G G E R N U L I F D L G C G G T F D U S I L
712 accattgaggatggtatctttgaggtgaaattctactgctggtgacacacattttgggtgggaaggactttgacaaccggtatggtcaaccac
211 T I E D G I F E U K S T A G D T H L G G E D F D N R M U N H
802 ttctgtcaggagtctcaaggaaggtacaaagaagattctaccaccaataagagggctctgcgacgtctcgaacagcgtgtgagagagcg
241 F U Q E F K R K Y K K D L T T N K R A L R L R L T A C E R A
892 aagcgaaacctgtcttctatccaccagggcagcattgaaattgattccttatatgaaggtatcgactctacacgtctatccaccggggc
271 K R T L S S S T Q A S I E I D S L Y E G I D F Y T S I T R A
982 cgtttcgaaactgaatgtgacctcttcagattcaaccatggagccagtggaagcttctcgtgatacgaagatggacaaagctc
301 R F E E L N A D L F R S T M E A P U E A K S L R D A K H D K A Q
1072 atccacgacatcgctcctcgtcggcggaatccaccgctattcttaagtgcaaaagctggttgcgaagactttctaatggcgaaggagctgaac
331 I H D I U L U G G S T R I P K U Q K L L Q D F F N G K E L M
1162 aaatccatcaaccctcgaagggcgtcgcgtacggcgccgcgcgtcagggctgccattcttcacacggcacaagctctgaggaagtacagggac
361 K_S I N P D E A U A Y G A U Q A I L H C G D K S E E U Q D
1252 ctgtt_tgttgcgtgacgtcactccctgtcgtcgggtatcgagaccgctggtggagtgatgaccacctcacaagcgcaaccaccaccatc
391 L L L L D U T P L S L G I E T A G G U M T T L I K R N T I
1342 cccacaagcagacacagaccttcaactacctctgacataacccggtgtgctcattccaagttttcgagggtgagcgtgcatgacc
421 P T K Q T Q T F T T V S D N Q P G U L I Q U F E G E R A M T
1432 aagggacaacacttacttggaaaattcgaaactgactggcattccccgtgctcgcgtggcggtgectcagatcgaggtgaccttcgatatt
451 K D N N A L L G K F E L T G G I P P A R G U P Q I E U T F D I
1522 gacgcaaacggcatctctgaacgtgtccgcgctcgagaagtcaccaacaaggagaaacaagatcagatcaccaacgacaaggcgccgctt
481 D A N G I L N_U_S_A U E K S T H K E N K I T I T H D K G R L
1612 tcgaaggaggagatcgaaacgtatggttcaacgaagctgagaagtcaggaacgaggacgagaaacagaaggataccatcgccggcgaagaac
511 S K E E I E R H U N E A E K Y R N E D E K Q K D T I G A K N
1702 gcacttgagtcttactgttcaacatgaagtcgacgtgaggagatgctaattctgaaggataagattctgagactgacaagcagaccatc
541 A L E S Y C F N H K S T M E D A N L K D K I S E T D K Q T I
1792 ctcgacaagtgcaatgacacaatcaagtggtggactctaatcagctggctgacaaggaggagtagcagcacaagcagaagaactggaa
571 L D K C N D T I K W L D S N Q L A D K E E Y E H K Q K E L
1882 ggcatttgcnaatccaatcactaagtgtaccagggagcgggtggagccccggaggcgtcccggtggatgctggtttccccggc
601 G I C N P I I T K L Y Q G A G G A P G G M P G G H P G G F P G
1972 ggagccccgggcggcgggcgagccctggtggcggcggcgccctaccatcgaggagggtcgattaaacacattccactctaccgaaa
631 G A P G A G A G A P G G G A G P T I E E U D *
2062 atatcgaggatattctctgcttacttacttcttttgcacatc

图1 二化螟 HSP70 基因的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig. 1 cDNA and predicted amino acid sequences of HSP70 of *Chilo suppressalis*

方框部分为 HSP70 家族签名序列, 下直划线序列表示真核细胞特征基序, 虚下划线序列为糖基化位点, 终止子 TAA 用星号标出。Three signature sequences of HSP70 family are shown in boxes. Functional motifs of eukaryotic cells are underlined. Underline with dots indicates glycosylation site. The stop codon is marked with an asterisk.

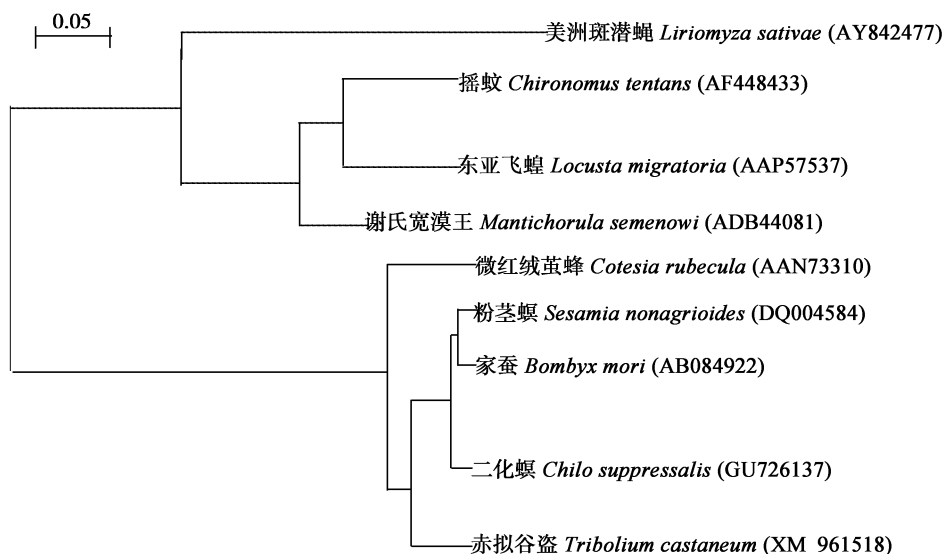


图2 基于 HSP70 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of HSP70

括号内为所引蛋白氨基酸序列的 GenBank 登录号。The GenBank accession numbers for amino acid sequence data were shown in brackets.

细胞 HSP70 mRNA 表达量分别提高了 1.73, 1.78 和 1.49 倍, 其中在 36℃ 时表达量最高, 39℃ 时 HSP70 mRNA 表达量下降, 但仍显著高于对照组 (图 3)。

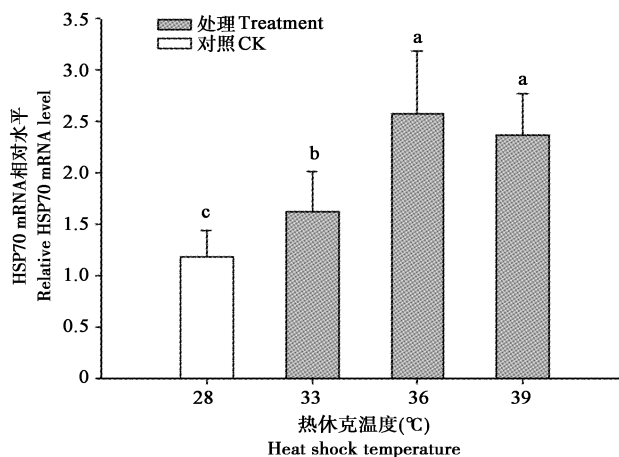


图 3 热胁迫温度对二化螟血淋巴细胞 HSP70 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Expression profiles of HSP70 mRNA in haemocytes from *Chilo suppressalis* under heat shock temperature

HSP70 mRNA 表达变化通过实时定量 PCR 检测。每一处理重复 3 次, 图中数据为平均值 $\pm$ 标准差, 不同小写字母表示 0.05 水平下显著性差异。HSP70 mRNA level was determined by real-time quantitative PCR. Each temperature treatment was repeated thrice. Data are mean $\pm$ SD, and different letters over the bars indicate that the means are significantly different ($P < 0.05$).

3.3 流式细胞仪检测 HSP70 蛋白表达

为了从蛋白质水平检测 HSP70 蛋白的表达量变化, 本实验采用间接荧光染色法对幼虫血淋巴细胞内的 HSP70 蛋白进行标记, 通过荧光强度来判断细胞内 HSP70 蛋白的表达。流式细胞定量分析显示, HSP70 蛋白对温度的应答趋势基本与在 mRNA 水平上一致。经过热胁迫处理, 血淋巴细胞的 HSP70 蛋白水平显著增加, 与对照相比, 在 33℃, 36℃ 和 39℃ 分别增加了 1.36, 2.16 和 1.99 倍, 其中 36℃ 和 39℃ 处理的 HSP70 蛋白的表达量显著高于 33℃ 的处理, HSP70 蛋白表达量在 36 ~ 39℃ 范围内没有显著变化 (图 4)。

4 讨论

本研究在获得中间片段的基础上, 采用 RACE 方法分别克隆 5' 末端和 3' 末端核苷酸序列, 最后通过重叠的方法, 将各个片段连接起来, 得到了二化螟 HSP70 基因全长 cDNA, 经氨基酸序列分析显

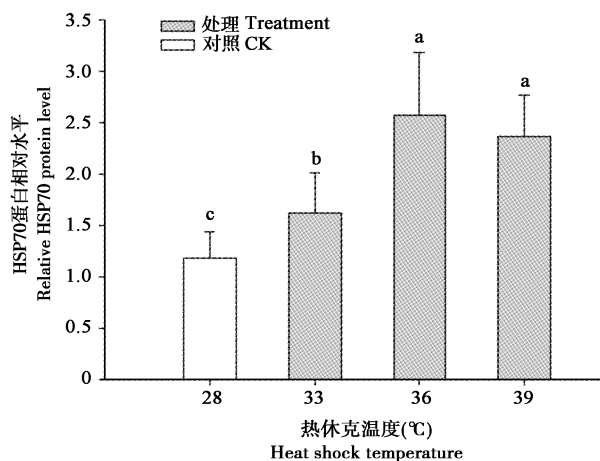


图 4 热胁迫温度对二化螟血淋巴细胞 HSP70 蛋白水平的影响

Fig. 4 Expression levels of HSP70 protein in haemocytes from *Chilo suppressalis* under heat shock temperature

HSP70 蛋白水平通过流式细胞术定量分析。每一处理重复 3 次, 图中数据为平均值 $\pm$ 标准差, 不同小写字母表示 0.05 水平下显著性差异。HSP70 protein was determined by using a flow cytometer. Each temperature treatment was repeated thrice. Data are mean $\pm$ SD, and different letters over the bars indicate that the means are significantly different ($P < 0.05$).

示, 该基因含有 HSP70 家族的 3 个签名序列和 Dnak 的特征基序 DLGTT-S-V; 靠近 C 端有 GGMP4 肽序列, C 末端是高度保守的细胞质特异性 EEDV 调控基序, 表明所克隆的二化螟 HSP70 基因是 Dnak 类型的细胞质 HSP70 基因。序列比对结果表明, 不同生物中的 HSP70 基因序列有较高的同源性。推导的氨基酸序列与已报道的其他昆虫 HSP70 氨基酸序列一致性达 70% 以上, 其中与粉茎螟 *S. nonagrioides* 及家蚕 *B. mori* 的关系最为接近, 同源性高达 97%, 说明 HSP70 蛋白保守性非常强。本研究中, 基于推导的氨基酸序列与已知的其他 8 种昆虫建立了同源进化树。

HSP70 蛋白主要由 2 种不同的基因所编码, 即组成型 HSC70 基因和诱导型 HSP70 基因 (Boutet *et al.*, 2003; Franzellitti and Fabbri, 2005)。正常情况下, HSC70 基因在所有细胞内均能表达, 且表达量稳定, 而 HSP70 基因不表达或表达量较少; 在环境胁迫因子刺激下, HSC70 基因在细胞内表达量维持不变或少量增加, 而 HSP70 基因高度诱导表达 (Boutet *et al.*, 2003; Deane and Woo, 2005)。为了研究二化螟 HSP70 基因表达, 本实验采用实时定量 PCR 技术检测了二化螟幼虫在热激条件下 HSP70 mRNA 转录水平的变化。实验发现热激显著诱导了

幼虫血淋巴细胞 HSP70 mRNA 表达, 不同热激强度处理, HSP70 mRNA 表达量各不相同, 可能是由于不同温度对机体细胞造成的影响不同。研究结果显示, 热休克反应中 HSP70 mRNA 的表达可能存在阈值, 二化螟幼虫血淋巴细胞内 HSP70 基因在 36℃ 时表达量最高, 超过 36℃, HSP70 mRNA 表达量下降, 36℃ 可能是诱导幼虫血淋巴细胞 HSP70 mRNA 表达的最佳热休克反应条件。Huang 和 Kang (2007) 研究发现, 美洲斑潜蝇 *L. sativae* HSP70 mRNA 被高温诱导表达的最高阈值出现在 42.5℃。

在热休克反应中, 热休克蛋白的变化取决于转录和翻译水平, 因为蛋白质是基因功能的表现形式, 不管 HSP70 mRNA 水平变化有多大, 如果没有 HSP70 蛋白执行功能, 细胞是不可能得到保护的。所以, 了解 HSP70 的转录和翻译之间的动态关系是极其重要的。传统上, 一般采用免疫印迹法对目的蛋白进行定量研究, 但在检测之前, 必须对总蛋白进行严格定量, 操作过程比较烦琐, 所得结果干扰因素多。流式细胞术(flow cytometry, FCM) 是一种适用于单细胞悬液、可逐个细胞检测目的蛋白的方法。与 Western blot 相比, 该方法操作简便、干扰因素少、所得结果更为精确可靠 (Renault *et al.*, 2001)。本研究用流式细胞术检测二化螟幼虫血淋巴细胞 HSP70 蛋白的表达量变化, 结果显示热胁迫诱导了 HSP70 蛋白大量合成, 与 HSP70 mRNA 水平上的表达高度一致, 说明二化螟幼虫血淋巴细胞 HSP70 在转录及翻译水平上受到热应激的调节。

HSP70 蛋白在体内的积累, 能使机体迅速适应环境的变化, 保护机体免受胁迫因子的伤害。有研究显示 HSP70 蛋白保护经过乙醇处理的星状胶质细胞免受氧化损伤及 DNA 伤害 (Russo *et al.*, 2001); 亚致死温度诱导 HSP70 蛋白表达能保护人角膜纤维原细胞免受氧化损伤 (Kim *et al.*, 2004); 热激后鲑鱼体内产生的 HSP70 蛋白能提高其抗高渗的能力 (Carpenter and Hofmann, 2000); 太阳照射下的果蝇幼虫和蛹体内大量表达 HSP70 蛋白后可以抵抗 40℃ 高温 (Feder and Krebs, 1997)。在本实验中, 热胁迫引起二化螟幼虫体内产生氧化应激反应, 显著提高了幼虫血淋巴细胞内 HSP70 蛋白水平, 但是热胁迫处理并没有导致幼虫血淋巴细胞凋亡的显著变化 (另文发表), 表明 HSP70 蛋白表达量的增加有效地消除了氧化应激对幼虫血淋巴细胞的伤害。实验中发现二化螟幼虫血淋巴细胞 HSP70 基因表达量在 36℃ 时最高, 39℃ 时表达量下降, 而

HSP70 蛋白表达量在 36 ~ 39℃ 范围内没有显著变化, 可能的原因是 HSP70 的 mRNA 和蛋白质对温度的应答快慢程度是不同的。由于转录和翻译在时间上的先后顺序, 蛋白质表达的应答晚于转录是正常的。以前的研究 (DiDomenico *et al.*, 1982) 表明 HSP70 蛋白合成达到一定阈值后开始下降。此外, HSP70 蛋白对细胞的保护作用不是无限的, 它只能在一定范围内起作用。一方面热休克蛋白的高表达提高了昆虫的耐热能力, 使昆虫免于温度胁迫带来的直接伤害; 但另一方面, 热休克蛋白的诱导表达可能会影响昆虫正常的生长发育, 从而对许多生理过程如生殖等带来负面的影响 (Krebs and Feder, 1997; Feder and Hofmann, 1999; Huang *et al.*, 2007)。昆虫在对外界环境适应的过程中必须在这两者中保持一定的平衡, 而这种平衡能力也反映了昆虫对环境的适应性进化。

总之, 昆虫在自然界中遭遇的高温胁迫非常普遍, 作为生物体在各种胁迫条件下诱导合成的热休克蛋白是当今生物抗逆生理学的一个重要研究内容。在以上研究中, 我们成功克隆了二化螟 HSP70 基因的全长 cDNA 序列, 通过对该基因在 mRNA 水平和蛋白质水平的热激动态变化分析, 有助于进一步了解二化螟幼虫对热胁迫适应的分子机制。

参 考 文 献 (References)

- Bahrndorff S, Mariën J, Loeschcke V, Ellers J, 2009. Dynamics of heat-induced thermal stress resistance and hsp70 expression in the springtail, *Orchesella cincta*. *Funct. Ecol.*, 23(2): 233–239.
- Boutet I, Tanguy A, Rousseau S, Auffret M, Moraga D, 2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperon.*, 8(1): 76–85.
- Carpenter CM, Hofmann GE, 2000. Expression of 70 kDa heat shock proteins in antarctic and New Zealand notothenioid fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 125(2): 229–238.
- Chen CM, Song HY, Zhou ZM, Liu QL, Zhao CW, Zhou YZ, 1957. The effectively accumulative temperature of rice stem borer and its application. *J. Hunan Agric. College*, 3: 127–131. [陈常铭, 宋慧英, 周祖铭, 刘琴乐, 赵春吾, 周云忠, 1957. 水稻二化螟有效积温的测定及其应用的初报. 湖南农学院学报 (自然科学版), 3: 127–131]
- Chen L, Zhang FC, Huang P, Ma J, 2007. Cloning and expression analysis of heat shock protein 70 gene from *Anatolica polita borealis* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta Entomologica Sinica*, 50(9): 883–888. [陈亮, 张富春, 黄萍, 马纪, 2007. 光滑鳖甲热休克蛋白 70 基因的克隆及表达. 昆虫学报, 50(9): 883–888]
- Cui XH, Xie M, Wan FH, 2007. Changes in expression level of heat

- shock protein 70 gene in *Bemisia tabaci* B-biotype (Homoptera: Aleyrodidae) under high temperature stress. *Acta Entomologica Sinica*, 50(11): 1087–1091. [崔旭红, 谢明, 万方浩, 2007. 高温胁迫下 B 型烟粉虱热激蛋白基因 *hsp70* 表达量的变化. 昆虫学报, 50(11): 1087–1091]
- Deane EE, Woo NYS, 2005. Cloning and characterization of the *hsp70* multigene family from silver sea bream; modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330(3): 776–783.
- DiDomenico BJ, Bugaisky GE, Lindquist S, 1982. The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell*, 31(3): 593–603.
- Feder ME, Hofmann GE, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 61: 243–282.
- Feder ME, Krebs RA, 1997. Ecological and evolutionary physiology of heat shock proteins and the stress response in *Drosophila*: complementary insights from genetic engineering and natural variation. *EXS*, 83: 155–173.
- Franzellitti S, Fabbri E, 2005. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336(4): 1157–1163.
- Hellmann JJ, 2002. The effect of an environmental change on mobile butterfly larvae and the nutritional quality of their hosts. *J. Anim. Ecol.*, 71(6): 925–936.
- Huang LH, Chen B, Kang L, 2007. Impact of mild temperature hardening on thermotolerance, fecundity, and Hsp gene expression in *Liriomyza huidobrensis*. *J. Insect Physiol.*, 53(12): 1199–1205.
- Huang LH, Kang L, 2007. Cloning and interspecific altered expression of heat shock protein genes in two leafminer species in response to thermal stress. *Insect Mol. Biol.*, 16(4): 491–500.
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR, 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.*, 143(7): 1883–1898.
- Kim YM, Kim HJ, Song EJ, Lee KJ, 2004. Glucuronic acid is a novel inducer of heat shock response. *Mol. Cell Biochem.*, 259(1–2): 23–33.
- Krebs RA, Feder ME, 1997. Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell Stress Chaperon.*, 2(1): 60–71.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Luo J, Zhang XX, Zhai BP, Guo YR, Zhu JH, 2005. Effect of high temperature on the growth, survival and reproduction of a laboratory population of the rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker. *Acta Ecologica Sinica*, 25(4): 931–936. [罗举, 张孝羲, 翟保平, 郭玉人, 朱建华, 2005. 高温对二化螟实验种群生长、存活和繁殖的影响. 生态学报, 25(4): 931–936.]
- McMillan DM, Fearnley SL, Rank NE, Dahlhoff EP, 2005. Natural temperature variation affects larval survival, development and Hsp70 expression in a leaf beetle. *Funct. Ecol.*, 19(5): 844–852.
- Qiang CK, Du YZ, Yu LY, Cui YD, Lu MX, Zheng FS, 2008. Dynamic changes of cold-resistant substances of overwintering *Chilo suppressalis* (Walker) larvae. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 19(3): 599–605. [强承魁, 杜予州, 于玲雅, 崔亚东, 陆明星, 郑福山, 2008. 水稻二化螟越冬幼虫耐寒性物质的动态变化. 应用生态学报, 19(3): 599–605]
- Qu LY, Sun XQ, Xiang JH, Hong XG, Zhang JX, Wang L, Li JY, 2004. Flow cytometer detection of HSP70 expression in haemocytes of *Chlamys farreri*. *Chinese High Technology Letters*, 14(4): 94–96. [曲凌云, 孙修勤, 相建海, 洪旭光, 张进兴, 王亮, 李继业, 2004. 栉孔扇贝血淋巴细胞 HSP70 表达变化的 FCM 法检测. 高技术通讯, 14(4): 94–96]
- Renault T, Xue QG, Chilmonczyk S, 2001. Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish Shellfish Immun.*, 11(3): 269–274.
- Russo A, Palumbo M, Scifo C, Cardile V, Barcellona ML, Renis M, 2001. Ethanol-induced oxidative stress in rat astrocytes: role of HSP70. *Cell Biol. Toxicol.*, 17(3): 153–168.
- Shen GX, Zhou RL, 2002. Experimental Techniques of Modern Immunology. Hubei Science and Technology Press, Wuhan. 226–235. [沈关心, 周汝麟, 2002. 现代免疫学实验技术. 武汉: 湖北科学技术出版社. 226–230]
- Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.*, 6: 1025–1037.
- Sørensen JG, Norry FM, Scannapieco AC, Loeschcke V, 2005. Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *J. Evol. Biol.*, 18(4): 829–837.
- Wang HH, Lei ZR, 2008. Detection of *hsp70* and *hsp90* transcription in *Bemisia tabaci* (B and ZHJ-1 Biotype) by fluorescence quantitative RT-PCR. *Scientia Agricultura Sinica*, 41(11): 3636–3644. [王海鸿, 雷仲仁, 2008. 用荧光定量 RT-PCR 方法分析 B 型和 ZHJ-1 型烟粉虱热休克基因 *hsp70* 和 *hsp90* 的表达. 中国农业科学, 41(11): 3636–3644]
- Wang XH, Kang L, 2005. Differences in egg thermotolerance between tropical and temperate populations of the migratory locust *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *J. Insect Physiol.*, 51(11): 1277–1285.
- Yocum GD, 2001. Differential expression of two HSP70 transcripts in response to cold shock, thermoperiod, and adult diapause in the Colorado potato beetle. *J. Insect Physiol.*, 47(10): 1139–1145.

(责任编辑: 赵利辉)